



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Caracterización de células germinales testiculares de  
*Vicugna pacos* (alpaca) y expresión de biomarcadores  
específicos en tejido gonadal**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**AUTOR**

Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA

**ASESOR**

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2018

## RESUMEN

El objetivo fue aislar células germinales testiculares de *Vicugna pacos*, caracterizarlas morfológicamente y detectar a nivel transcripcional la expresión de biomarcadores específicos para Células Madre Espermatogoniales en tejido gonadal durante el desarrollo testicular posnatal. Los testículos fueron colectados en estancias alpaqueras de Ayacucho y Huancavelica (Aprox. 4,200 m.s.n.m.) y en el Matadero Municipal de Huancavelica (Aprox. 3,600 m.s.n.m.). La biometría testicular, el aislamiento de espermatogonias y la determinación de viabilidad y rendimiento, así como la citometría de flujo, se hicieron a partir de muestras frescas. Para la extracción de RNA por el método del fenol/cloroformo, los testículos fueron previamente obtenidos por castración del animal vivo, transportados en nitrógeno líquido a -196°C y almacenados en ultracongelación a -80°C. Se diseñaron *primers* con el Programa Oligo6, a partir de exones rescatados y RNA ensamblados para alpaca, tomando como base los exones codificantes de cada uno de los biomarcadores encontrados en el genoma de *Bos taurus*, los mismos que fueron sintetizados por MacroGen (Corea del Sur) y utilizados para amplificar el cDNA de alpaca. La viabilidad y el rendimiento fueron superiores en alpacas de 10-12 meses de edad, con valores de 92.15% y  $55 \times 10^6$  espermatogonias/ml, respectivamente. Las espermatogonias de alpaca tuvieron un diámetro promedio de 16  $\mu$ , las células germinales de alpaca mostraron reactividad frente al conjugado del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína con la aglutinina de *Dolichos biflorus*. A partir de siete biomarcadores positivos para SSC seleccionados (*Zbtb16*, *GFR $\alpha$ -1*, *Stra8*, *Nanos2*, *Ngn3*, *Lin28* y *Ecad*), tres negativos (*Ckit*, *Sohlh1* y *Sohlh2*) y tres genes de referencia (*Rplp0*, *Gadph* y *Actb*), se lograron detectar *Nanos2*, *Lin28*, *Ckit*, *RPLP0* y *Actb* en tejido testicular de alpaca. Se concluye que la edad más apropiada para aislar espermatogonias, caracterizarlas morfológicamente y detectar biomarcadores específicos de SSC en alpaca, es de 10-12 meses.

**Palabras Clave.** Alpaca, biometría testicular, biomarcadores testiculares, células madre espermatogoniales.

## ABSTRACT

The objective was to isolate testicular germ cells from *Vicugna pacos*, characterize them morphologically and detect at the transcriptional level the expression of specific biomarkers for Spermatogonial Stem Cells in gonadal tissue during postnatal testicular development. The testicles were collected in estancias alpaqueras of Ayacucho and Huancavelica (approximately 4,200 m.a.s.l.) and in the Matadero Municipal de Huancavelica (approximately 3,600 m.a.s.l.). Testicular biometry, the isolation of spermatogonia and the determination of viability and yield, as well as flow cytometry, were made from fresh samples. For the extraction of RNA by the phenol/chloroform method, the testicles were previously obtained by castration of the live animal, transported in liquid nitrogen at -196°C and stored in deep-freeze at -80°C. Primers were designed with the Oligo6 Program, from rescued exons and RNA assemblies for alpaca, based on the coding exons of each of the biomarkers found in the *Bos taurus* genome, which were synthesized by Macrogen (South Korea) and used to amplify the alpaca cDNA. Feasibility and yield were higher in alpacas of 10-12 months of age, with values of 92.15% and  $55 \times 10^6$  spermatogonia/ml, respectively. Alpaca spermatogonia had an average diameter of 16  $\mu$ , the alpaca germ cells showed reactivity to fluorescein fluorochrome isothiocyanate conjugate with *Dolichos biflorus* agglutinin. From seven positive biomarkers for selected SSC (*Zbtb16*, *GFR $\alpha$ -1*, *Stra8*, *Nanos2*, *Ngn3*, *Lin28* and *Ecad*), three negative (*Ckit*, *Sohlh1* and *Sohlh2*) and three reference genes (*Rplp0*, *Gadph* and *Actb*); *Nanos2*, *Lin28*, *Ckit*, *RPLP0* and *Actb* were detected in testicular tissue of alpacas. It is concluded that the most appropriate age to isolate spermatogonia, characterize them morphologically and detect specific biomarkers of SSC in alpaca, is 10-12 months.

**Keywords.** Alpaca, testicular biometry, testicular biomarkers, spermatogonial stem cells.